

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑫① Numéro de dépôt: **88402884.6**

⑫② Date de dépôt: **17.11.88**

⑫⑤ Int. Cl.⁴: **C 07 K 13/00**

C 07 K 7/06, C 12 N 9/20,

G 01 N 33/68, A 61 K 37/02

⑫③ Priorité: **20.11.87 FR 8716096**

⑫④ Date de publication de la demande:
28.06.89 Bulletin 89/26

⑫⑧ Etats contractants désignés: **CH DE GB LI NL**

⑫⑦ Demandeur: **COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE**
31/33, rue de la Fédération
F-75015 Paris (FR)

⑫⑦② Inventeur: **Menez, André**
109 avenue Claude Nicolas Ledoux Magny les Hameaux
F-78470 St Rémy Les Chevreuse (FR)

Chwetzoff, Serge
Le Coteau 1 rue de la Gruerie
F-91190 Gif Sur Yvette (FR)

⑫⑦④ Mandataire: **Ores, Irène et al**
CABINET ORES 6, Avenue de Messine
F-75008 Paris (FR)

⑫⑤④ **Protéine basique dénommée phospholipase A2 isolée de venin de serpent de la famille des élapidés et sa séquence en amino-acides, dérivés et fragments de ladite protéine, leur procédé d'obtention, compositions thérapeutiques et agents de diagnostic contenant ladite protéine et/ou ses dérivés et/ou ses fragments.**

⑫⑤⑦ **Protéine basique isolée de venin de serpent de la famille des Elapidés notamment d'un serpent Naja et plus particulièrement de Naja nigricollis et/ou de Naja mossambica pallida, dénommée phospholipase A2 (PLA2), fragments et dérivés de ladite protéine, leurs procédés d'obtention, des compositions pharmaceutiques utilisables en médecine humaine et/ou vétérinaire, ainsi que des agents de diagnostic contenant ladite protéine et/ou ses dérivés et/ou ses fragments.**

Ladite protéine comprend 118 amino-acides, son poids moléculaire est de l'ordre de 13 300 Daltons et son point isoélectrique est de l'ordre de 8,6.

Les dérivés de ladite protéine sont modifiés au niveau de l'une des histidines par fixation d'un groupe alkyle de formule R-CH₂-X.

Application à la détection de cellules tumorales.

Description

PROTEINE BASIQUE DENOMMEE PHOSPHOLIPASE A2 ISOLEE DE VENIN DE SERPENT DE LA FAMILLE DES ELAPIDES ET SA SEQUENCE EN AMINO-ACIDES, DERIVES ET FRAGMENTS DE LADITE PROTEINE, LEUR PROCEDE D'OBTENTION, COMPOSITIONS THERAPEUTIQUES ET AGENTS DE DIAGNOSTIC CONTENANT LADITE PROTEINE ET/OU SES DERIVES ET/OU SES FRAGMENTS.

La présente invention est relative à une protéine basique isolée de venin de serpent de la famille des Elapidés, notamment d'un serpent *Naja* et plus particulièrement de *Naja mossambica pallida* et/ou de *Naja nigricollis*, dénommée phospholipase A2 (PSA2), aux fragments et dérivés de ladite protéine, à leurs procédés d'obtention, à des compositions thérapeutiques utilisables en médecine humaine et/ou vétérinaire, ainsi qu'à des agents de diagnostic contenant ladite protéine et/ou ses dérivés et/ou ses fragments.

Il existe à l'heure actuelle de nombreux agents antitumoraux, substances organiques ou inorganiques. Ces différents agents ont une action sur le noyau cellulaire, en particulier celui des cellules tumorales. Selon les substances, il existe plusieurs mécanismes d'action : soit lesdites substances interfèrent avec la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines, soit elles interfèrent avec la duplication de l'ADN, soit elles agissent sur le fuseau mitotique. Un certain nombre d'auteurs ont mis en évidence ces différents mécanismes d'action (RALPH R.K. et al., TIBS, 1983, 212-214, LIPPARD, Science, 1982, 218, 4577, 1075-1082, FAUVAUDON, Biochimie, 1982, 64, 457-475).

Toutefois, les substances anticancéreuses n'exercent pas spécifiquement leur action sur les cellules cancéreuses. Elles inhibent les divisions cellulaires des cellules saines comme des cellules cancéreuses : elles sont donc toxiques pour tous les tissus où les cellules se renouvellent rapidement. Les différentes substances antitumorales évoquées présentent donc un grand nombre d'effets indésirables chez l'homme.

L'importance des effets indésirables a conduit à rechercher de nouveaux agents antitumoraux, ayant un mode et un site d'action différents et ne présentant pas les effets indésirables tels que ceux rencontrés avec les substances antitumorales existantes.

Récemment, il a été démontré que certaines substances secrétées par des cellules de diverses lignées, telles que, notamment, les lymphocytes B et T, ainsi que les macrophages (Ruddle, Immunol. Today, 1987, 8, 5, 129-130) sont capables de tuer les cellules de certaines lignées tumorales. Les gènes (ADNc) codant pour ces substances ont été clonés (GRAY et al., Nature, 1984, 312, 721-724 et PENNICA et al., Nature, 1984, 312, 724-727). On nomme ces substances, facteurs de nécrose des tumeurs (TNF) et lymphotoxines (LT) ; il faut noter que le mécanisme d'action de ces substances est à l'heure actuelle, inconnu.

Un autre groupe de substances, est extrêmement intéressant ; il s'agit de substances présentes dans les venins de serpent ; en effet ceux-ci sont capables de tuer les cellules cancéreuses de nombreuses lignées (CHAIM-MATYAS et al., Life

Sciences, 1987, 40, 16, 1601-1607) ; les auteurs de cette publication ont en particulier montré que les venins de serpent présentent une activité cytotoxique vis à vis de certains mélanomes et chondrosarcomes, tant in vitro qu'in vivo et que, notamment, le venin de *Naja nigricollis* présente une forte activité cytotoxique.

Cette activité cytotoxique semble fondée sur un mécanisme de lyse membranaire des cellules concernées, totalement différent des mécanismes d'action des substances antitumorales de l'Art antérieur.

Le venin de cobra cracheur d'Afrique de l'Est, *Naja nigricollis*, comme le venin de la plupart des Elapidés, renferme trois classes de protéines toxiques : des toxines curarisantes, des cardiotoxines et des phospholipases.

La cardiotoxine, élément prépondérant du venin est pour une part, responsable de l'action cytotoxique ; cependant l'activité cytotoxique du venin total est nettement supérieure à celle de la cardiotoxine seule. En outre, l'action cytotoxique du venin est conservée en présence de calcium, un inhibiteur de l'activité cytotoxique des cardiotoxines. Un ou plusieurs facteurs cytotoxiques, autre que la cardiotoxine, existent donc dans le venin de *Naja*, en particulier de *Naja nigricollis*.

Les phospholipases sont classées en différents groupes, en fonction de leur létalité. Le premier groupe inclut des phospholipases A2 acides ou neutres, présentant une faible toxicité ; ces PLA2 assurent essentiellement la digestion des tissus phospholipidiques. Le second groupe est composé de PLA2 extrêmement toxiques ; ce sont, soit des molécules basiques monomères, soit des molécules contenant une sous-unité basique. On trouve ces composés dans de nombreux venins de serpents, ceux-ci provoquant une paralysie rapide des proies. Ils sont caractérisés par une capacité de blocage de la libération de l'acétylcholine au niveau des terminaisons présynaptiques et par d'autres effets incluant notamment une myotoxicité importante. Le troisième groupe comprend des PLA2 toxiques et fortement basiques ; on les trouve dans un certain nombre de venins de serpents, mais leur rôle et leur mécanisme d'action étaient jusqu'à présent peu connus ; la PLA2 basique de *Naja nigricollis* appartient à cette catégorie.

La présente invention s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à une protéine, isolée de venin de serpent *Naja*, qui présente des propriétés thérapeutiques intéressantes vis à vis de l'homme.

C'est aussi un but de l'invention de pourvoir à des fragments de ladite protéine présentant une activité antitumorale tout en n'étant pas toxiques.

C'est encore un but de l'invention de pourvoir à des dérivés de ladite protéine obtenus par traitement de celle-ci par un agent approprié et présentant

une activité antitumorale tout en n'étant pas toxiques.

C'est encore un but de l'invention de pourvoir à un procédé d'isolement de ladite protéine.

C'est encore un but de l'invention de pourvoir à un procédé de préparation des dérivés, et/ou des fragments de ladite protéine.

C'est également un but de l'invention d'utiliser lesdits dérivés et/ou fragments dans des compositions pharmaceutiques.

C'est également un but de l'invention d'utiliser lesdits dérivés et/ou fragments comme agents de détection sélective des cellules tumorales.

C'est en outre un but de l'invention de fournir un kit, ou coffret, ou ensemble coordonné, prêt à l'emploi, pour la détection sélective des cellules tumorales.

La présente invention a pour objet une protéine basique du type des phospholipases A2 (PLA2), isolée de venins de serpents, notamment de la famille des Elapidés, caractérisée en ce qu'elle comprend 118 amino-acides, en ce que son poids moléculaire est de l'ordre de 13 325 Daltons, en ce que son point isoélectrique est de l'ordre de 8,6, en ce qu'elle est obtenue à partir de venin de serpent de la famille des Elapidés, notamment d'un serpent Naja et plus particulièrement de Naja nigricollis ou de Naja mossambica pallida, ou le cas échéant par voie de synthèse ou par clonage et en ce qu'elle présente à la fois une activité enzymatique et une activité cytotoxique.

La masse moléculaire a été déterminée par gel-filtration (PAGE - SDS) en référence à l'alpha-neurotoxine de Naja nigricollis (PM : 6 800), au cytochrome C (PM : 12 500), à l'inhibiteur de trypsine de germe de soja (PM : 21 500) et à la sérum albumine bovine (PM 68 000).

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite protéine, elle répond à la formule I ci-après :

Asn¹-Leu-Tyr-Gln-Phe-Lys-His-Met-Ile-His¹⁰-Cys-Thr-Val-Pro-Ser-Arg-Pro-Val-Val-His²⁰-Phe-Ala-Asp-Tyr-Gly-Cys-Tyr-Cys-Gly-Arg³⁰-Gly-Gly-Lys-Gly-Thr-Pro-Ile-Asp-Asp-Leu⁴⁰-Asp-Arg-Cys-Cys-Gln-Val-His-Asp-Asn-Cys⁵⁰-Tyr-Glu-Lys-Ala-Gly-Lys-Met-Gly-Cys-Trp⁶⁰-Pro-Tyr-Phe-Thr-Leu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-Cys⁷⁰-Ser-Lys-Gly-Thr-Leu-Thr-Cys-Asn-Gly-Arg⁸⁰-Asn-Gly-Lys-Cys-Ala-Ala-Ala-Val-Cys-Asn⁹⁰-Cys-Asp-Leu-Val-Ala-Ala-Asn-Cys-Phe-Ala¹⁰⁰-Gly-Ala-Pro-Tyr-Ile-Asn-Ala-Asn-Tyr-Asn¹¹⁰-Ile-Asp-Phe-Lys-Lys-Arg-Cys-Gln¹¹⁸-OH.

Les Inventeurs ont mis en évidence que l'action toxique létale de ladite protéine est due à la conjugaison de deux actions, à savoir une action cytotoxique et une action enzymatique.

L'invention a également pour objet les fragments et/ou des dérivés de ladite protéine, présentant une activité cytotoxique identique ou analogue à celle de ladite protéine.

Ces dérivés et/ou fragments, outre qu'ils présentent une activité cytotoxique analogue à celle de la phospholipase A2 ne présentent pas l'activité enzymatique de cette dernière, en sorte qu'ils ne sont pas toxiques, l'une des composantes de la conjugaison d'actions précitée étant absente, lesdits dérivés présentant cependant une activité antitumorale

sélective.

Parmi lesdits fragments, elle englobe, entre autres:

5 - un peptide caractérisé en ce qu'il est constitué d'un fragment de la PLA2 et en ce qu'il présente la séquence en amino-acides suivante, qui correspond aux amino-acides en positions 1 à 8 de ladite protéine :

-Asn¹-Leu-Tyr-Gln-Phe-Lys-Asn-Met⁸-,

10 - un peptide caractérisé en ce qu'il est constitué d'un fragment de PLA2 et en ce qu'il présente la séquence en amino-acides suivante, qui correspond aux amino-acides en positions 55-59 de ladite PLA2 :
-Gly⁵⁵-Lys-Met-Gly-Cys⁵⁹-,

15 - un peptide caractérisé en ce qu'il est constitué d'un fragment de PLA2 et en ce qu'il présente la séquence en amino-acides suivante, qui correspond aux amino-acides en positions 44-50 de ladite PLA2
-Cys⁴⁴-Gln-Val-His-Asp-Asn-Cys⁵⁰-,

20 L'invention englobe également les dérivés de ladite protéine, présentant une modification de l'une des histidines présente dans la séquence de ladite protéine, caractérisés en ce qu'ils présentent une activité cytotoxique identique ou analogue à celle de ladite protéine tout en ne présentant pas l'activité enzymatique de celle-ci et en ce qu'ils sont modifiés par fixation sur ladite histidine d'un groupe alkyle de formule R-CH₂-X, dans laquelle X est un atome d'halogène, de préférence de brome, et R est un groupe aliphatique ou aromatique comprenant de 1
25 30 à 20 atomes de carbone.

L'agent alkylant est avantageusement fixé sur l'histidine en position 47 de la protéine selon l'invention et est de préférence du bromure de bromophénacyle.

35 La présente invention a également pour objet des conjugués, caractérisés en ce que lesdits protéine, fragments et/ou dérivés, sont couplés à une substance de transport sélectif vers un cible appropriée, notamment vers une cellule tumorale, laquelle substance de transport est choisie dans le groupe qui comprend notamment les hormones, les immunoglobulines polyclonales et les immunoglobulines monoclonales.

45 La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de la phospholipase A2 (PLA2) selon l'invention, caractérisé en ce que ladite protéine est extraite de venin de serpent de la famille des Elapidés, notamment de serpent Naja, et plus particulièrement de Naja nigricollis ou de Naja mossambica pallida par chromatographie par échange d'ions suivie d'une élution par un sel alcalin d'un acide organique faible, notamment de l'acétate d'ammonium, en ce que les fractions éluées présentant une activité enzymatique, sont soumises à une
50 deuxième chromatographie par échange d'ions, et en ce que la protéine ainsi isolée est soumise à une chromatographie liquide haute performance afin d'être purifiée.

60 La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de dérivés selon l'invention, caractérisé en ce que dans une première étape, on isole la phospholipase A2 (PLA2), selon le procédé décrit ci-dessus, en ce que dans une seconde étape, l'on met en contact ladite phospholipase A2 avec un
65

agent alkylant de type R-CH₂-X, où X est un atome d'halogène, de préférence de brome, et R est un groupe aliphatique ou aromatique comprenant de 1 à 20 atomes de carbone, pour modifier la phospholipase au niveau de l'une des histidines présente dans sa séquence, par fixation de l'agent alkylant sur ladite histidine.

L'agent alkylant se fixe préférentiellement sur l'histidine 47 de ladite PLA2 et est avantageusement du bromure de bromophénacyle.

En variante, les dérivés de la phospholipase A2 sont obtenus par un procédé de génie génétique, caractérisé en ce que le cDNA codant pour ladite protéine est modifié par voie génétique au niveau du fragment 44-50 tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de fragments selon l'invention, caractérisé en ce que lesdits fragments sont obtenus par coupure protéolytique, notamment trypsique et/ou chymotrypsique.

La présente invention a aussi pour objet une composition thérapeutique qui comprend une quantité active d'au moins un dérivé de la phospholipase A2 et/ou un fragment de celle-ci, couplé ou non à une molécule de transport, comme principe actif, notamment pour le traitement des cancers, lequel dérivé et/ou fragment est éventuellement associé à tout véhicule adapté à son administration.

La présente invention a également pour objet un agent de détection de cellules tumorales, caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué par un dérivé et/ou fragment de la phospholipase A2 obtenu conformément à la présente invention.

La présente invention a en outre pour objet un kit, ou coffret, ou ensemble coordonné, prêt à l'emploi pour la détection de cellules tumorales, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une quantité appropriée, éventuellement subdivisée en doses unitaires, de dérivé ou fragment selon l'invention,
- éventuellement une quantité appropriée de tampons, diluants, réactifs, nécessaires à la mise en oeuvre de ladite détection.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit kit, le dérivé est la pBp-PLA2, obtenue par fixation de bromure de bromophénacyle sur l'histidine 47 de la phospholipase A2 selon l'invention.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui comprend un exemple de préparation d'un dérivé de phospholipase A2 ainsi qu'un compte-rendu d'expérimentations effectuées pour démontrer l'activité cytotoxique spécifique vis-à-vis des cellules tumorales des dérivés et/ou fragments selon l'invention, ainsi que la bonne tolérance desdits dérivés et/ou fragments en comparaison avec la phospholipase A2 de venin de *Naja nigricollis*.

Il doit être bien entendu, toutefois, que cet exemple et ce compte-rendu d'expérimentations sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple A : Extraction et purification de la PLA2

Le venin lyophilisé provient de l'Institut Pasteur. 3 g de venin sont dissous dans 15 ml d'eau. Après centrifugation, la solution est déposée sur une résine échangeuse d'ions (Biorex 70, Biorad) à laquelle on applique un gradient linéaire d'acétate d'ammonium entre 0,14 M et 1,4 M. Quatre des 10 fractions ainsi séparées possèdent une activité hydrolytique vis-à-vis de la lécithine de jaune d'oeuf, comme l'indiquent des expériences réalisées au pH-stat selon une méthode décrite précédemment (DENNIS E.A., J.Lipid Res., 1986, 14, 152-159). La plus basique d'entre elles, nommée PLA2, est soumise à une nouvelle chromatographie sur résine Biorex 70 en présence d'un gradient linéaire compris entre 0,60 M et 0,95 M. La PLA2 est enfin soumise à une chromatographie liquide à haute performance en phase inverse sur une colonne butyl à larges pores Nucléosil 5 µm. L'enzyme est éluée par un gradient d'acétonitrile, dans un mélange eau-acide trifluoroacétique.

Le profil d'élution est montré sur la figure 1, qui représente le profil d'élution du venin de *Naja nigricollis*, après chromatographie sur résine échangeuse d'ions Biorex 70. La résine, au préalable, a été équilibrée dans un tampon d'acétate d'ammonium 0,14 M, pH 7,4. Le venin a ensuite été appliqué au sommet d'une colonne (30 x 1 cm). Une fraction, non retenue est éluée immédiatement. Elle renferme une phospholipase A2 comme en témoigne la présence d'un astérique. Après élution de cette fraction, on applique un gradient d'acétate d'ammonium entre 0,14 M et 1,4 M au même pH. La phospholipase A2 la plus toxique, également indiquée par un astérisque, est éluée dans la dernière fraction, c'est-à-dire la plus à droite sur la figure. C'est cette fraction qui est soumise à une nouvelle chromatographie sur résine Biorex, puis à une HPLC.

Exemple B : Préparation de la PLA2 - pBp :

La PLA2 obtenue selon l'exemple A est mise en contact avec du bromure de para bromophénacyle (pBp), dont on sait qu'il interagit préférentiellement sur l'histidine du site actif des phospholipases (VOLWERK et al., Biochem, 1974, 13, 1446-1454).

Les conditions expérimentales de ce traitement sont les suivantes : 150 nmoles de PLA2 sont solubilisées dans 2 ml de tampon cacodylate de sodium 0,1 M), contenant 0,1 M de NaCl, pH 6. On ajoute à cette solution un excès de pBp (5 fois molaire) dans 50 µl d'acétone. Après 5 heures d'agitation continue dans le noir et à 30° C, le pH du mélange réactionnel est ramené à 3 par addition d'acide acétique glacial. L'échantillon est lyophilisé, puis soumis à une chromatographie liquide à haute performance (colonne butyl à larges pores). Le produit est élué dans un gradient d'hydrophobicité croissante (acétonitrile).

TESTS PHARMACOLOGIQUES

EXEMPLE 1 : Comparaison des séquences de la PLA2 et de son dérivé pBp.

- Séquence en amino-acides de la PLA2.

La séquence en amino-acides complète de la phospholipase basique de venin de *Naja nigricollis*, est déterminée sur la base des peptides obtenus par clivage au moyen de bromure de cyanogène et par protéolyse au moyen de *A. Lyticus* lysylendopeptidase et *S. aureus* V8 protéase.

La protéine comprend 118 amino-acides et possède 14 restes 1/2 cystine.

Le fractionnement de la phospholipase traitée au bromure de cyanogène et carboxyméthylée, fournit 3 peptides de 8, 49 et 61 amino-acides respectivement.

D'autres fragmentations permettent d'obtenir d'autre séquences. Le recouvrement de ces différentes séquences a permis d'établir celle de la PLA2.

- Dérivé pBp.

Le dérivé pBp-PLA2 a perdu une histidine par molécule et son coefficient d'extinction molaire à 276,5 nm est de 45 500.

EXEMPLE 2 : Toxicité comparée de la PLA2 et de ses dérivés.

La PLA2 et ses dérivés ont été injectés séparément à des souris (18-20g Balb c, femelles) par voie intraveineuse. La PLA2 et ses dérivés sont dissous dans 0,3 ml de soluté physiologique. Une dose de 10 µg de PLA2 non modifiée est mortelle pour chaque souris. En revanche, une dose de 2,3 mg de PLA2-pBp est non létale pour chaque souris.

TABLEAU I

Proteines	DL ₅₀
PLA2 native basique	5,7 ± 0,2.10 ⁻¹⁰ moles (7,7 ± 0,3 µg)
CNBr - PLA2	> 1,63.10 ⁻⁷ moles
pBp - PLA2	> 1,60.10 ⁻⁷ moles

Le tableau I montre les DL₅₀ de la PLA2, du dérivé pBp - PLA2 et du dérivé traité au CNBr. La toxicité a été mesurée en injectant les doses indiquées, solubilisées dans 0,3 ml de soluté physiologique, dans la veine de la queue de la souris Balb c (20 ± 1 g). La survie est observée 24 heures après l'injection puis, si nécessaire, chaque jour pendant une semaine au moins. Le signe > signifie, qu'à la dose indiquée, les souris qui ont eu une injection, ne sont pas mortes.

La PLA2 est caractérisée par une activité létale importante. En opposition, les deux dérivés sont non toxiques.

EXEMPLE 3 : Mesure de l'activité cytotoxique de la PLA2 et de son dérivé pBp.

Les mesures des activités cytotoxiques de la phospholipase PLA2 et de son dérivé pBp s'effec-

tuent de la manière suivante : une suspension de cellulose d'une souche homogène définie, contenant 3,5.10⁶ cellules par ml dans un milieu PBS-DULBEC-CO, sans calcium et sans magnésium, reçoit des quantités variables de phospholipase ou de son dérivé. L'incubation se poursuit une heure à 37°C. Un colorant, le bleu trypan, est ajouté au milieu. Seules les cellules cytolysées fixent ce colorant. La mesure du nombre de cellules cytolysées permet d'apprécier l'activité cytotoxique du composé étudié. La quantification de cette activité cytotoxique est donnée par la concentration du composé qui tue 50 % des cellules étudiées (AC₅₀), bruit de fond déduit. Le tableau II ci-après montre les concentrations cytotoxiques (AC₅₀%) de la PLA2 et de son dérivé pBp vis-à-vis de huit lignées cellulaires dont cinq sont tumorales et trois sont saines.

TABLEAU II

SOUCHES CELLULAIRES	PLA2 AC ₅₀ (M)	PLA2-pBp AC ₅₀ (M)
Transformées		
MCF7 (Ho)	1,5.10 ⁻⁶	3.10 ⁻⁵
HLGO (Ho)	3.10 ⁻⁶	5,5.10 ⁻⁵
SK-N-SH (Ho)	5.10 ⁻⁶	4.10 ⁻⁶
BW (Mu)	3.10 ⁻⁶	> 8.10 ⁻⁵
C13T (Mu)	3.10 ⁻⁶	3.10 ⁻⁵
Normales		
Cellules péritonéales murines	10 ⁻⁵	> 8.10 ⁻⁵
Cellules spléniques murines	10 ⁻⁶	> 4.10 ⁻⁵
Lymphocytes T murins	5.10 ⁻⁶	> 8.10 ⁻⁵

Ce tableau indique les concentrations de phospholipase A2 (PLA2) ou modifiée (pBp-PLA2), qu'il est nécessaire de mettre en oeuvre, afin de tuer des cellules transformées ou normales. L'expression > x (où x représente une concentration exprimée en mole/l), indique qu'en présence de ladite concentration de la PLA2 ou de son dérivé, les cellules concernées ne meurent pas.

On voit que la PLA2 naturelle, est cytotoxique pour l'ensemble des souches cellulaires étudiées, qu'elles soient saines ou tumorales. En revanche, le dérivé PLA2-pBp se caractérise par une cytotoxicité sélective pour les cellules tumorales. Quatre des cinq souches transformées sont détruites par cette substance tandis que les trois lignées cellulaires saines ne sont pas altérées.

La figure 2 montre la cinétique de cytolysé des cellules FL, en présence de différentes concentrations de PLA2 de venin de *Naja nigricollis*; en abscisse on a le temps en heures, et en ordonnées, on a le pourcentage de cytolysé :

□ correspond à 2 µM de PLA2
◇ correspond à 1 µM de PLA2
+ correspond à 0,5 µM de PLA2

x correspond à 0,25 μM de PLA2

■ correspond à 0 μM de PLA2

La lyse membranaire des cellules est révélée par un test de pénétration au Bleu Trypan.

Cette figure montre que la PLA2 basique est fortement cytotoxique et que l'effet cytotoxique de la PLA2 dépend à la fois du temps d'incubation et de la concentration en PLA2.

EXEMPLE 4 : Mesure de l'activité enzymatique de la PLA2 et de ses dérivés.

L'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme qui hydrolyse par minute 1 μmole de phosphatidylcholine à $5,5 \cdot 10^{-2}$ M, en présence de Triton X100 0,11M à 40°C, pH8. Les valeurs de V_{max} sont déterminées dans les mêmes conditions, en utilisant 10^{-8} M de PLA2.

Le tableau III ci-après montre que la PLA2 basique présente une activité lipolytique sur la lécithine de jaune d'oeuf. L'activité catalytique est nettement supérieure en présence de Ca^{++} qu'en présence de Sr^{++} et n'est pas détectée en présence d'EDTA, même à des concentrations en PLA2 égales à 10^{-6} M.

TABLEAU III

	Act. Enzymatique (pmoles de PLA2)	Km (mM)	V_{max} (μM NaOH/min.)
PLA2 (Ca^{++})	20 ± 2	$7,53 \pm 0,20$	500 ± 14
PLA2 (Sr^{++})	59 ± 3	$7,51 \pm 0,20$	170 ± 10
PLA2 (EDTA)	aucune		
CNBr-PLA2 (Ca^{++})	294 ± 11	$16,30 \pm 0,25$	34 ± 5
pBp-PLA2(Ca^{++})	aucune		

Le dérivé pBp-PLA2, selon l'invention ne présente pas d'activité enzymatique détectable ; le dérivé CNBr-PLA2 présente une activité catalytique faible mais significative.

La figure 3 montre la lyse de cellules FL après 60 mn d'incubation en présence de différentes concentrations de PLA2 (avec \blacklozenge 6 mM EDTA, \blacksquare 2mM Sr^{++} , \blacktriangle 2mM Ca^{++}) et de dérivés chimiquement traités au bromure de cyanogène (\diamond) et au bromure de para bromophénacyle (\square). Ces expérimentations ont été menées à 37°C, sauf pour \boxplus (2mM Ca^{++} à 4°C). Les autres conditions sont celles de la figure 2.

On a en abscisse, la concentration en protéine en μM et en ordonnées, le pourcentage de cellules lysées.

Comme le montre cette figure, les courbes doses-réponses obtenues avec la PLA2, en présence ou en absence de calcium, en présence ou en absence de strontium, en présence ou en absence d'EDTA, sont identiques.

On a vérifié que la présence de fortes concentrations de cations divalents ou d'EDTA ne modifie pas la stabilité des cellules pendant la période d'incuba-

tion.

La lyse membranaire des cellules est réalisée sur des cellules FL à 37°C ou à 4°C pendant 60 mn, mais aucune différence significative n'a été observée pour les courbes à 4°C.

Deux dérivés de la PLA2 ont également été testés ; il s'agit du pBp-PLA2, selon l'invention, obtenu après traitement au bromure de bromophénacyle et du dérivé résultant du clivage de la PLA2 au moyen de bromure de cyanogène en milieu acide.

La figure 3 montre que le dérivé pBp-PLA2 possède une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules FL, alors que le dérivé traité au CNBr ne présente pas d'activité cytotoxique.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

Revendications

1°) Protéine basique du type des phospholipases A2 (PLA2), isolée de venins de serpents, notamment de la famille des Elapidés, caractérisée en ce qu'elle comprend 118 amino-acides, en ce que son poids moléculaire est de l'ordre de 13 325 Daltons, en ce qu'elle est obtenue à partir de venin de serpent de la famille des Elapidés, notamment d'un serpent Naja et plus particulièrement de Naja nigricollis ou de Naja mossambica pallida, ou le cas échéant par voie de synthèse ou par clonage et en ce qu'elle présente à la fois une activité enzymatique et une activité cytotoxique.

2°) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule I ci-après :

Asn¹-Leu-Tyr-Gln-Phe-Lys-His-Met-Ile-His¹⁰-Cys-Thr-Val-Pro-Ser-Arg-Pro-Val-Val-His²⁰-Phe-Ala-Asp-Tyr-Gly-Cys-Tyr-Cys-Gly-Arg³⁰-Gly-Gly-Lys-Gly-Thr-Pro-Ile-Asp-Asp-Leu⁴⁰-Asp-Arg-Cys-Cys-Gln-Val-His-Asp-Asn-Cys⁵⁰-Tyr-Glu-Lys-Ala-Gly-Lys-M et Gly-Cys-Trp⁶⁰-Pro-Tyr-Phe-Thr-Leu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-Cys⁷⁰-Ser-Lys-Gly-Thr-Leu-Thr-Cys-Asn-Gly-Arg⁸⁰-Asn-Gly-Lys-Cys-Ala-Ala-Ala-Val-Cys-Asn⁹⁰-Cys-Asp-Leu-Val-Ala-Ala-Asn-Cys-Phe-Ala¹⁰⁰-Gly-Ala-Pro-Tyr-Ile-Asn-Ala-Asn-Tyr-Asn¹¹⁰-Ile-Asp -Phe-Lys-Lys-Arg-Cys-Gln¹¹⁸-OH.

3°) Fragment de la protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par un peptide présentant la séquence en amino-acides suivante, qui correspond aux amino-acides en positions 1 à 8 de ladite protéine :

-Asn¹-Leu-Tyr-Gln-Phe-Lys-Asn-Met⁸-,

4°) Fragment de la protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce

qu'il est constitué par un peptide présentant la séquence en amino- acides suivante, qui correspond aux amino-acides en positions 55-59 de ladite protéine :

-Gly⁵⁵-Lys-Met-Gly-Cys⁵⁹-,

5°) Fragment de la protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par un peptide présentant la séquence en amino-acides suivante, qui correspond aux amino-acides en positions 44-50 de ladite protéine.

-Cys⁴⁴-Gln-Val-His-Asp-Asn-Cys⁵⁰-,

6°) Dérivés de la protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2, présentant une modification de l'une des histidines présente dans la séquence de ladite protéine, caractérisés en ce qu'ils présentent une activité cytotoxique identique ou analogue à celle de ladite protéine tout en ne présentant pas l'activité enzymatique de celle-ci et en ce qu'ils sont modifiés par fixation sur ladite histidine d'un groupe alkyle de formule R-CH₂-X, dans laquelle X est un atome d'halogène, de préférence de brome, et R est un groupe aliphatique ou aromatique qui comprend de 1 à 20 atomes de carbone.

7°) Conjugués caractérisés en ce que la protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2, les fragments et/ou dérivés selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, sont couplés à une substance de transport sélectif vers une cible appropriée, notamment vers une cellule tumorale, laquelle substance de transport est choisie dans le groupe qui comprend notamment les hormones, les immunoglobulines polyclonales et les immunoglobulines monoclonales.

8°) Procédé d'obtention de la phospholipase A2 (PLA2) selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que ladite protéine est extraite de venin de serpent de la famille des Elapidés, notamment de serpent Naja, et plus particulièrement de Naja nigricollis ou de Naja mossambica pallida par chromatographie par échange d'ions suivie d'une élution par un sel alcalin d'un acide organique faible, notamment de l'acétate d'ammonium, en ce que les fractions éluées présentant une activité enzymatique sont soumises à une deuxième chromatographie par échange d'ions et ce que la protéine ainsi isolée est soumise à une chromatographie liquide haute performance afin d'être purifiée.

9°) Procédé d'obtention de dérivés selon la revendication 6, caractérisé en ce que dans une première étape, on isole la phospholipase A2 en mettant en oeuvre le procédé selon la revendication 8, en ce que dans une seconde étape l'on met en contact ladite phospholipase A2 avec un agent alkylant de type R-CH₂-X, où X est un atome d'halogène et R est un groupe aliphatique ou aromatique comprenant de 1 à 20 atomes de carbone, pour modifier la phospholipase au niveau de l'une des histidines présente dans sa séquence par fixation de

l'agent alkylant sur ladite histidine.

10°) Procédé d'obtention des dérivés selon la revendication 6, caractérisé en ce que le cDNA codant pour la protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2 est modifié par voie génétique au niveau du fragment 44-50 de ladite protéine.

11°) Procédé d'obtention de fragments selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisé en ce que lesdits fragments sont obtenus par coupure protéolytique, notamment trypsique, et/ou chymotrypsique.

12°) Composition thérapeutique, notamment pour le traitement des cancers, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité active d'au moins un dérivé et/ou d'au moins un fragment, éventuellement couplés à une substance de transport sélectif vers une cible appropriée, notamment vers une cellule tumorale, selon l'une quelconque des revendications 3 à 7, comme principe actif, lequel dérivé et/ou fragment est éventuellement associé à tout véhicule adapté à son administration.

13°) Agent de détection des cellules tumorales, caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué par un dérivé et/ou fragment selon l'une quelconque des revendications 3 à 6.

14.) Kit, ou coffret, ou ensemble coordonné, prêt à l'emploi pour la détection de cellules tumorales, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une quantité appropriée, éventuellement subdivisée en doses unitaires, de dérivé et/ou fragment selon l'une quelconque des revendications 3 à 6,

- éventuellement une quantité appropriée de tampons, diluants, réactifs, nécessaires à la mise en oeuvre de ladite détection.

15°) Kit selon la revendication 14, caractérisé en ce que le dérivé est de la pBp-PLA2, obtenue par fixation de bromure de bromophénacyle sur l'histidine 47 de la protéine selon la revendication 1 ou selon la revendication 2.

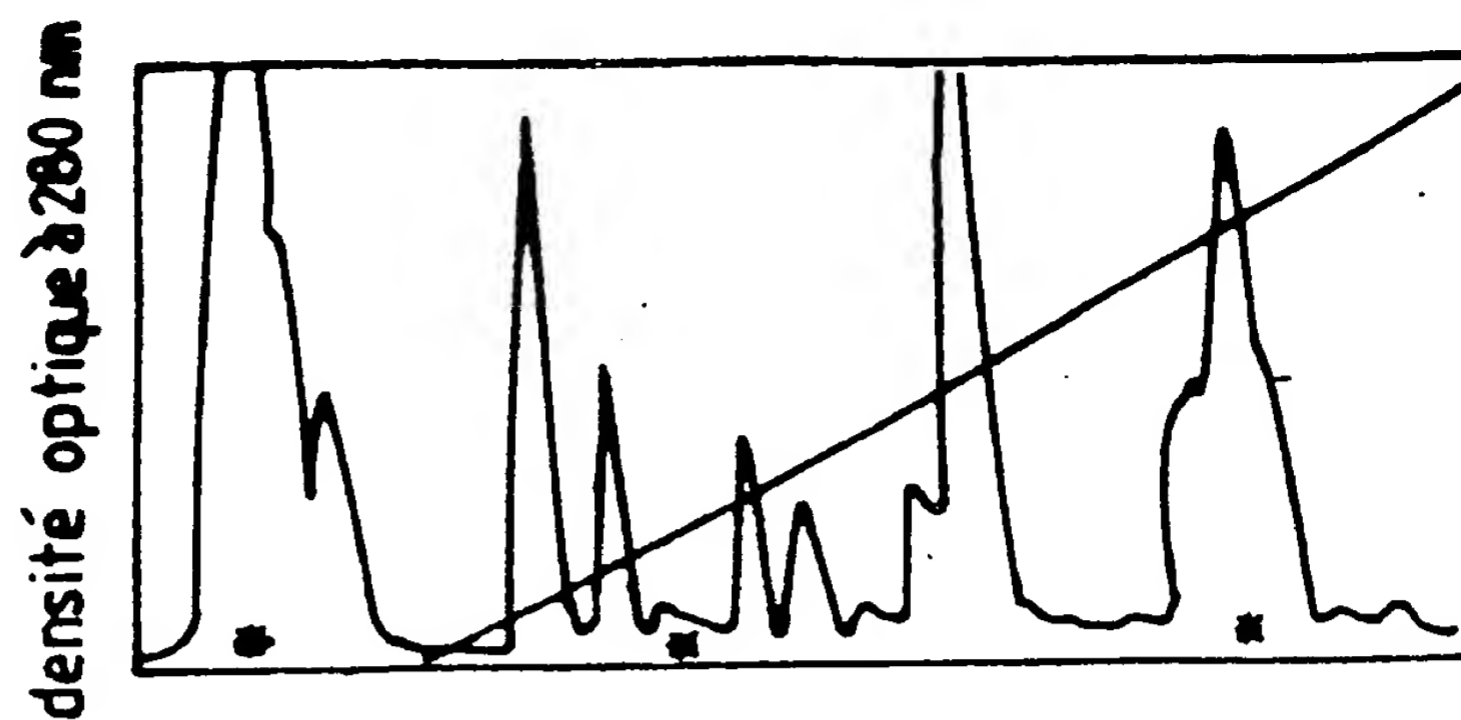


FIG. 1

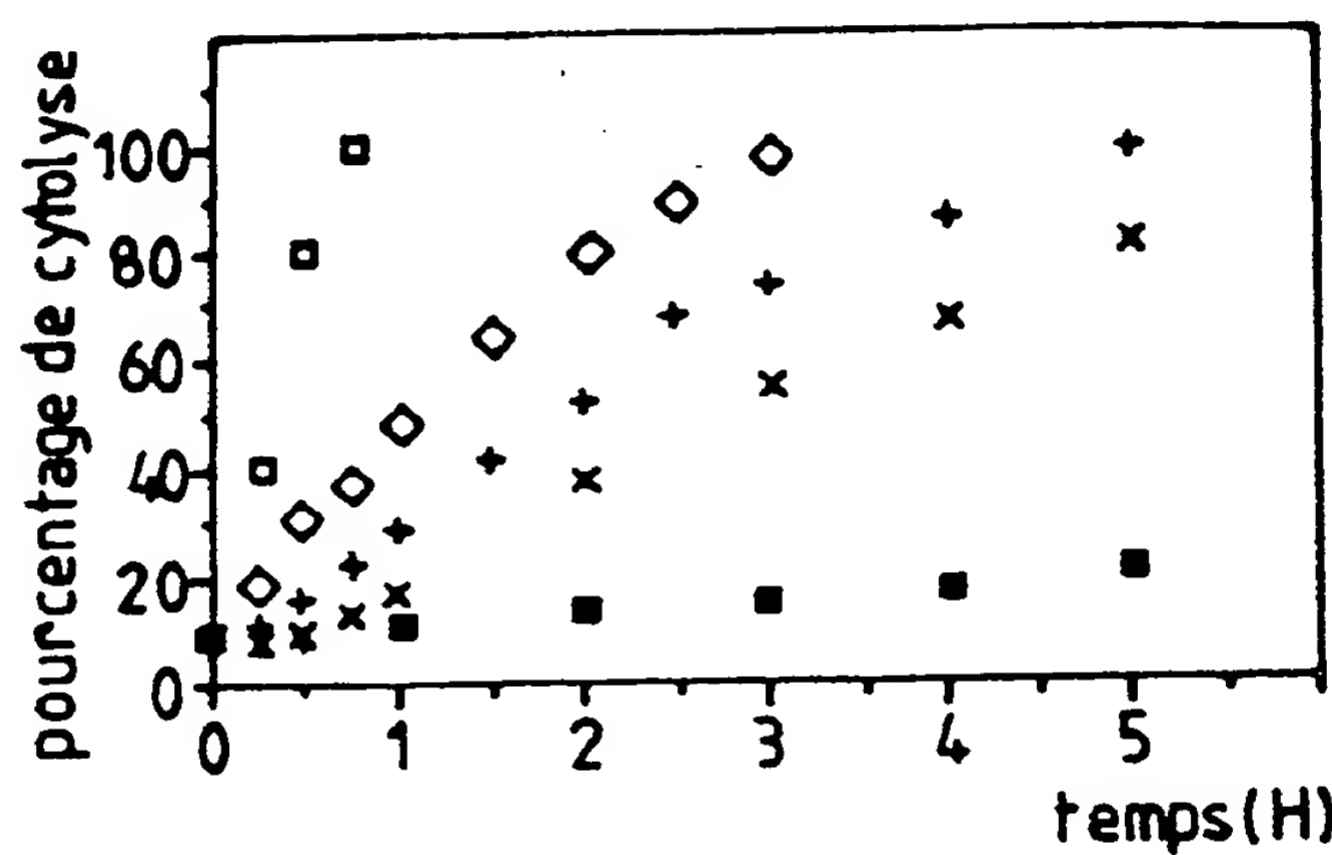


FIG. 2

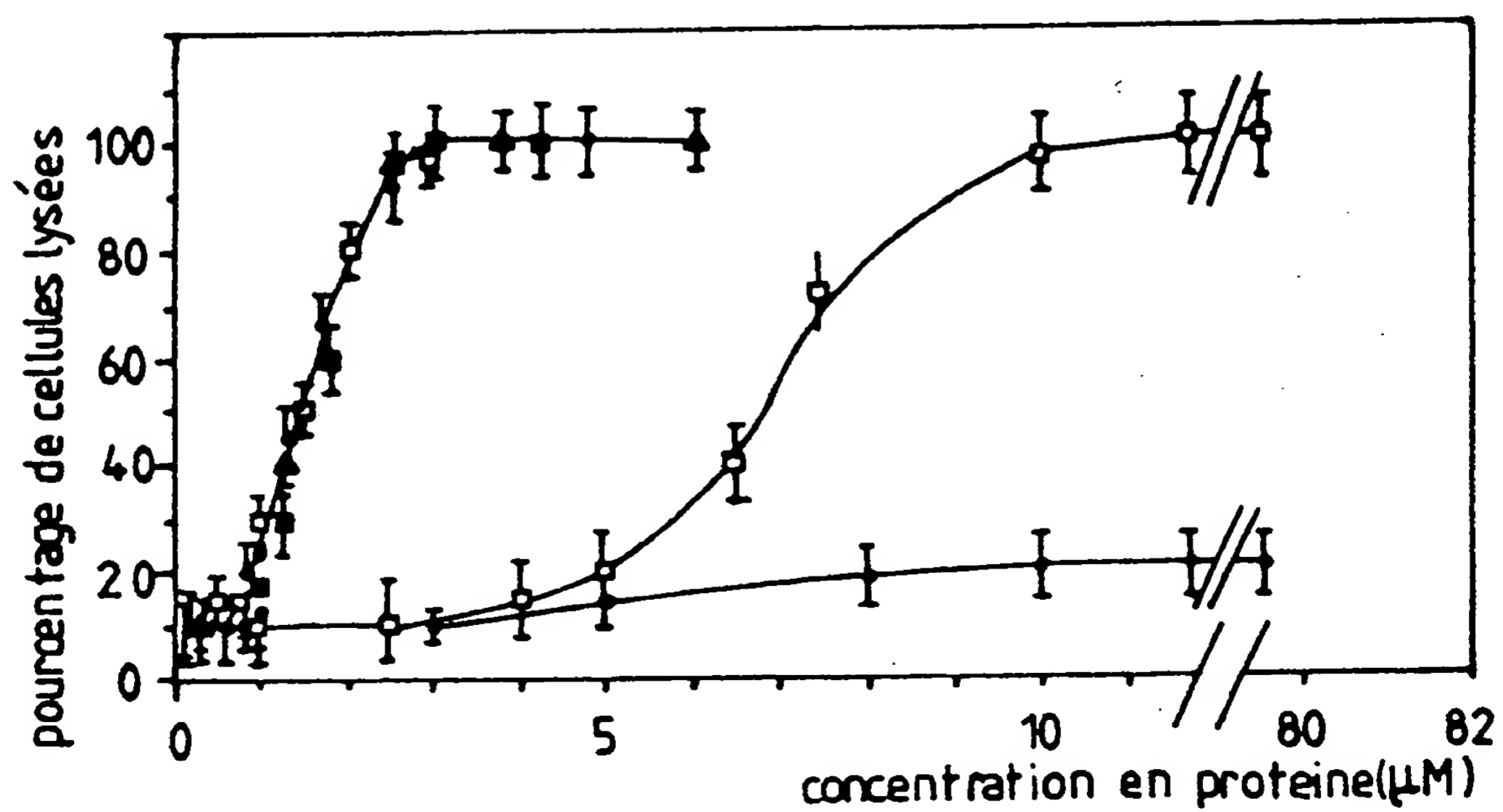


FIG. 3



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)		
X	THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 98, no. 2, août 1985, pages 289-303, The Japanese Biochemical Society; N. TAMIYA et al.: "Non-divergence theory of evolution: Sequence comparison of some proteins from snakes and bacteria" * En entier * ---	1	C 07 K 13/00 C 07 K 7/06 C 12 N 9/20 G 01 N 33/68 A 61 K 37/02		
X	TOXICON, vol. 19, 1981, pages 61-71, Pergamon Press Ltd, GB; E. CONDREA et al.: "Effect of modification of one histidine residue on the enzymatic and pharmacological properties of a toxic phospholipase A2 from Naja Nigricollis snake venom and less toxic phospholipases A2 from Hemachatus Haemachatus and Naja Naja Atra snake venoms" * En entier *	1,6,9			
Y	IDEM. ---	8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)		
D,X	LIFE SCIENCES, vol. 40, no. 16, 20 avril 1987, pages 1601-1607, Pergamon Journals Ltd., New York, US; A. CHAIM-MATYAS et al.: "Cytotoxic activity of various snake venoms on melanoma, B16F10 and chondrosarcoma" * En entier * ---	1,7,12,13	C 07 K 13/00 C 07 K 7/00 C 12 N 9/00 G 01 N 33/00 A 61 K 37/00		
Y	PHARMACIA, septembre 1986, FPMG 50-01-329, pages 6-7, 17-18, Laboratory Separation Division, Uppsala, SE; "FPLC: Media and column guide - High performance separation of biomolecules" * Pages 6,7,17,18 * --- -/-	8			
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications					
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 16-02-1989	Examineur NOVOA Y SANJURJO M.A.		
<table border="0"><tr><td>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</td><td>Legende T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</td></tr></table>				CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	Legende T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	Legende T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant				



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)		
A	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 137, no. 3, 15 décembre 1983, pages 545-551, FEBS; M.J. DUFTON et al.: "Classification of phospholipases A2 according to sequence - Evolutionary and pharmacological implications" ---				
A	TOXICON, vol. 24, no. 7, 1986, pages 679-693, Pergamon Journals Ltd, GB; K.R. SOONS et al.: "Effects of modification of tyrosines 3 and 62 (63) on enzymatic and toxicological properties of phospholipases A2 from Naja Nigricollis and Naja Naja Atra snake venoms" -----				
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)		
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications					
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 16-02-1989	Examineur NOVOA Y SANJURJO M.A.		
<table border="0"><tr><td>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</td><td>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</td></tr></table>				CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant				

European Patent Office

11 Publication no. 0 322 262
A 1

Application for European Patent

21 Application no. 88402884.6
22 Date of submission : 17.11.8851 Int. Cl.4 C 07 K 13/00
C 07 K 7/06, C 12 N 9/20
G 01 N 38/68, A 61 K 37/02

30	Priority : 20.11.87 FR 8716096	71 Applicant :	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31/22, rue de la Fédération F-75016 Paris (FR)
43	Date of publication of application : 28.06.89 Bulletin 89/26	72 Inventor :	Menez, André 109 avenue Claude Nicolas Ledoux Magny les Hamcaux F-78470 St. Remy Les Chevreuse (FR)
84	Designated contracting states : CH DE GB LI NL		Chwetzoff, Serge Le Coteau 1 rue de la Gruerie F-91190 Gil Sur Yvette (FR)
		74 Agent	Ores, Irene et al. CABINET ORES 6, Avenue de Messine F-75008 Paris (FR)

54 Basic protein called phospholipase A2 isolated from the venom of snakes of the family of the Elapidae and its amino-acid sequence, derivatives and fragments of the said protein, the procedure for obtaining them, therapeutic compounds and diagnostic agents containing the said protein and/or its derivatives and/or fragments.

57 Basic protein isolated from the venom of snakes of the family of the Elapidae, particularly the Naja snake and more particularly Naja nigricollis and/or Naja mossambica pallida, called phospholipase A2 (PLA2), fragments and derivatives of the said protein, the procedures for obtaining them, pharmaceutical compounds utilisable in human and/or veterinary medicine, as well as diagnostic agents containing the said protein and/or its derivatives and/or fragments.

The said protein contains 118 amino-acids, its molecular weight is of the order of 13 300 Daltons and its isoelectric point is of the order of 8.6.

The derivatives of the said protein are modified at the point of one of the histidines by means of the fixation of an alkyl group with the formula $R-CH_2-X$.

Application to the detection of tumoral cells.

EP 0 322 262 A1

Description

BASIC PROTEIN CALLED PHOSPHOLIPASE A2 ISOLATED FROM THE VENOM OF SNAKES OF THE FAMILY OF THE ELAPIDAE AND ITS AMINO-ACID SEQUENCE, DERIVATIVES AND FRAGMENTS OF THE SAID PROTEIN, THE PROCEDURE FOR OBTAINING THEM, THERAPEUTIC COMPOUNDS AND DIAGNOSTIC AGENTS CONTAINING THE SAID PROTEIN AND/OR ITS DERIVATIVES AND/OR FRAGMENTS

The present invention relates to a basic protein isolated from the venom of snakes of the family of the Elapidae, particularly the Naja snake and more particularly Naja nigricollis and/or Naja mossambica pallida, called phospholipase A2 (PSA2) [sic], fragments and derivatives of the said protein, the procedures for obtaining them, therapeutic compounds utilisable in human and/or veterinary medicine, as well as diagnostic agents containing the said protein and/or its derivatives and/or fragments.

At the present time, there are many anti-tumour agents, organic or inorganic substances, in existence. These different agents act on the cell nucleus, in particular that of the tumour cells. Depending on the substance involved, there are different action mechanisms : either the said substances interfere with the bio-synthesis of nucleic acids and proteins, or they interfere with the duplication of the DNA, or they act on the mitotic spindle. A number of authors have described these different action mechanisms (RALPH R.K., et al., TIBS, 1983, 212-214, LIPPARD Science, 1982, 218, 4577, 1075-1082, FAUVAUDON, Biochimie, 1982, 64, 467-475).

However, these anti-cancer substances have not specifically acted on the cancerous cells. They inhibit the cellular division of healthy cells, in the same way as cancerous cells : they are therefore toxic to all tissues where the cells are rapidly renewed. The different anti-tumour substances referred to therefore display a large number of undesirable effects on the individual.

The scale of the undesirable effects has accordingly led to the search for new anti-tumour agents, which would have a different mode of action and different action site and would not display the undesirable effects encountered in the case of existing anti-tumour substances.

It has recently been demonstrated that some substances secreted by cells from different sources such as, in particular, lymphocytes B and T, as well as macrophages (Ruddle, Immunol. Today, 1987, 8, 5, 129 - 130) are capable of killing cells of certain tumour sources. The genes (DNAC) encoding these substances have been cloned (GRAY et al., Nature, 1984, 312, 721-724 and PENNICA et al., Nature, 1984, 312, 724-727). These substances are called tumour necrotic factors (TNF) and lymphotoxins (LT); it should be noted that the action mechanism of these substances is not understood at present.

There is another group of substances which is extremely interesting : these are substances present in snake venom : in fact, these are capable of killing cancerous cells from many sources (CHAIM-MATYAS, et al., Life Sciences, 1987, 40, 16, 1601-1607) : the authors of this publication have in particular shown that snake venom displays a cytotoxic activity vis-à-vis some melanomas and chondrosarcomas, both in vitro and in vivo, and, in particular, the venom of Naja nigricollis displays strong cytotoxic activity.

This cytotoxic activity seems to be based on a mechanism of membrane lysis on the cells concerned, totally different from the action mechanisms of anti-tumour substances [disclosed] in this area heretofore.

Venom from the spitting East African cobra, *Naja nigricollis*, like the venom of the majority of the Elapidae, contains three classes of toxic proteins : curarine toxins, cardiotoxins and phospholipases.

The cardiotoxin, the predominant element of the venom is partly responsible for the cytotoxic action : however, the cytotoxic activity of the total venom is significantly greater than that of the cardiotoxin alone. In addition, the cytotoxic action of the venom is maintained in the presence of calcium, an inhibitor of the cytotoxic activity of cardiotoxins. Therefore one or more cytotoxic factors, in addition to the cardiotoxin, must exist in the venom of the *Naja*, in particular *Naja nigricollis*.

The phospholipases are classed in different groups, depending on their lethality. The first group includes acid or neutral A2 phospholipases, with low toxicity : these PLA2's essentially ensure the digestion of the phospholipidic tissues. The second group is made up of extremely toxic PLA2's : these are either basic monomer molecules, or molecules containing a basic sub-unit. These compounds are found in many snake venoms; they cause rapid paralysis of prey. They are characterised by a capacity to block the release of acetylcholine in the area of the pre-synaptic terminals and by other effects including, in particular, considerable myotoxicity. The third group includes toxic highly basic PLA2's : they are found in a number of snake venoms, but their role and action mechanism were little understood until now : the basic PLA2 of *Naja nigricollis* belongs to this category.

The present invention has therefore taken as its objective to provide a protein, isolated from the venom of the *Naja* snake, which displays therapeutic properties which are of interest vis-à-vis man.

It is also an objective of the invention to provide fragments of the said protein displaying anti-tumour activity without being toxic.

It is a further objective of the invention to provide derivatives of the said protein, obtained by treating it with an appropriate agent, and displaying anti-tumour activity without being toxic.

It is a further objective of the invention to provide a procedure for the isolation of the said protein.

It is a further objective of the invention to provide a procedure for the preparation of derivatives and/or fragments of the said protein.

It is also an objective of the invention to use the said derivatives and/or fragments in pharmaceutical compounds.

It is also an objective of the invention to use the said derivatives and/or fragments as selective detection agents in relation to tumoral cells.

It is furthermore an objective of the invention to supply a kit, or pack, or co-ordinated set, ready for use, for the selective detection of tumoral cells.

The subject of the present invention is a basic protein of the phospholipase A2 (PLA2) type, isolated from the venom of snakes particularly from the family of the Elapidae, characterised by containing 118 amino-acids, having a molecular weight of the order of 13 325 Daltons

and an isoelectric point of the order of 8.6, being obtained from the venom of snakes of the family of the Elapidae, particularly the Naja snake and more particularly Naja nigricollis and/or Naja mossambica pallida, or where relevant, by way of synthesis or cloning and displaying enzymatic activity and cytotoxic activity simultaneously.

The molecular mass was determined by gel-filtration (PAGE - SDS) by reference to the alpha-neurotoxin of Naja nigricollis (M Wt. : 6 800), cytochrome C (M Wt. : 12 500), seed oil trypsin inhibitor (M Wt. : 21 500) and bovine albumin serum (M Wt. 68 000).

On the basis of a favourable production method for the said protein, it has the following Formula 1 :

Asn¹-Leu-Tyr-Gin-Phe-Lys-His-Met-Ile-His¹⁰-Cys-Thr-Val-Pro-Ser-Arg-Pro-Val-Val-His²⁰-Phe-Ala-Asp-Tyr-Gly-Cys-Tyr-Cys-Gly-Arg³⁰-Gly-Gly-Lys-Gly-Thr-Pro-Ile-Asp-Asp-Leu⁴⁰-Asp-Arg-Cys-Cys-Gin-Val-His-Asp-Asn-Cys⁵⁰-Tyr-Glu-Lys-Ala-Gly-Lys-Met-Gly-Cys-Trp⁶⁰-Pro-Tyr-Phe-Thr-Leu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-Cys⁷⁰-Ser-Lys-Gly-Thr-Leu-Thr-Cys-Asn-Gly-Arg⁸⁰-Asn-Gly-Lys-Cys-Ala-Ala-Ala-Val-Cys-Asn⁹⁰-Cys-Asp-Leu-Val-Ala-Ala-Asn-Cys-Phe-Ala¹⁰⁰-Gly-Ala-Pro-Tyr-Ile-Asn-Ala-Asn-Tyr-Asn¹¹⁰-Ile-Asp-Phe-Lys-Lys-Arg-Cys-Gin¹¹⁸-OH.

The inventors have demonstrated that the lethal toxic action of the said protein is due to the conjugation of two actions, which are a cytotoxic action and an enzymatic action.

The invention also has as its subject the fragments and/or derivatives of the said protein, displaying a cytotoxic activity which is identical or analogous to that of the said protein.

These derivatives and/or fragments, apart from displaying a cytotoxic activity analogous to that of phospholipase A2, do not display the enzymatic activity of the latter, with the result that they are not toxic, one of the components of the conjugation of actions referred to above being absent, the said derivatives however displaying a selective anti-tumour activity.

Among the said fragments, it covers, inter alia :

- a peptide characterised by being constituted of a fragment of PLA2 and displaying the following sequence of amino-acids, which corresponds to the amino-acids at positions 1 to 8 of the said protein :
-Asn¹-Leu-Tyr-Gin-Phe-Lys-Asn-Met⁸-
- a peptide characterised by being constituted of a fragment of PLA2 and displaying the following sequence of amino-acids, which corresponds to the amino-acids at positions 55-59 of the said PLA2 :
-Gly⁵⁵-Lys-Met-Gly-Cys⁵⁹-
- a peptide characterised by being constituted of a fragment of PLA2 and displaying the following sequence of amino-acids, which corresponds to the amino-acids at positions 44-50 of the said PLA2 :
-Cys⁴⁴-Gin-Val-His-Asp-Asn-Cys⁵⁰-

The invention also covers the derivatives of the said protein, displaying a modification of one of the histidines present in the sequence of the said protein, characterised by displaying a cytotoxic activity identical or analogous to that of the said protein, while not displaying its enzymatic activity and by being modified by fixation on the said histidine of an alkyl group with the formula R-CH₂-X, where X is a halogen atom, preferably of bromine, and R is an aliphatic or aromatic group comprising between 1 and 20 atoms of carbon.

The alkylant agent is advantageously fixed on to the histidine at position 47 of the protein according to the invention and is preferably bromo-phenacyl bromide.

The present invention likewise has, as subject, conjugates characterised by having the said protein, fragments and/or derivatives linked to a substance providing selective transport to an appropriate target, in particular a tumoral cell, with this transport substance being chosen from the group comprising in particular the hormones, polyclonal immunoglobulins and monoclonal immunoglobulins.

The present invention also has as subject a procedure for obtaining phospholipase A2 (PLA2) according to the invention, characterised by the said protein being extracted from the venom of snakes from the Elapidac family, in particular the Naja snake, and more particularly Naja nigricollis or Naja mossambica pallida, by chromatography through exchange of ions followed by elution by an alkaline salt of a weak organic acid, in particular ammonium acetate, with the eluted fractions displaying an enzymatic activity, being subjected to a second process of chromatography by exchange of ions, and with the protein thus isolated being subjected to high performance liquid chromatography in order to be purified.

The present invention also has as subject a procedure for obtaining derivatives according to the invention, characterised by the fact that, as a first stage, the phospholipase A2 (PLA2) is isolated according to the procedure outlined above, and as a second stage, the said phospholipase A2 is put in contact with an alkylant agent of type $R-CH_2-X$, where X is a halogen atom, preferably of bromine, and R is an aliphatic or aromatic group comprising between 1 and 20 atoms of carbon, to modify the phospholipase at the point of one of the histidines present in its sequence, by fixation of the alkylant agent onto the said histidine.

The alkylant agent attaches itself preferably to histidine 47 of the said PLA2 and it is advantageous for it to be bromo-phenacyl bromide.

As a variant, the derivatives of phospholipase A2 are obtained by a genetic engineering process, characterised by having the cDNA encoding for the said protein being modified by genetic means at the point of fragment 44-50 as defined above.

The present invention also has as subject a procedure for obtaining fragments according to the invention, characterised by the fact that the said fragments are obtained by proteolytic split, in particular trypsin and/or chymotrypsin.

The present invention also has as subject a therapeutic compound which contains an active quantity of at least one derivative of phospholipase A2 and/or a fragment of this, whether or not linked with a transport molecule, as an active principle, particularly for the treatment of cancers, this derivative and/or fragment possibly being associated with any vehicle suitable for its administration.

The present invention also has as subject an agent for the detection of tumoral cells, characterised by being essentially constituted of a derivative and/or fragment of phospholipase A2, obtained in accordance with the present invention.

In addition, the present invention has as subject a kit, or pack, or co-ordinated set, ready for use, for the detection of tumoral cells, characterised by containing :

- an appropriate quantity, possibly sub-divided into unit doses, of derivative or fragment in accordance with the invention,
- possibly an appropriate quantity of buffers, diluents and reagents as necessary for carrying out the said detection.

According to a favourable production method for the said kit, the derivative is pBp-PLA2, obtained by the fixation of bromo-phenacyl bromide to histidine 47 of phospholipase A2 in accordance with the invention.

In addition to the preceding provisions, the invention includes further additional provisions, which will emerge from the description to follow, which includes an example of the preparation of a derivative of phospholipase A2 as well as a report on experiments carried out to demonstrate the specific cytotoxic activity, vis-à-vis tumoral cells, of the derivatives and/or fragments according to the invention, as well as the good tolerance of the said derivatives and/or fragments compared with the phospholipase A2 from *Naja nigricollis* venom.

However, it should be clearly understood that this example and this report on experiments are given solely as an illustration of the subject of the invention, and that they do not in any way constitute a limitation of it.

Example A : Extraction and purification of PLA2

The lyophilised venom comes from the Pasteur Institute. 3 g of venom are dissolved in 15 ml water. Following centrifugation, the solution is deposited on an ion exchanger resin (Biorex 70, Biorad), to which a linear gradient of acetate of ammonium of between 0.14 M and 1.4 M is applied. Four of the 10 fractions thus separated display hydrolytic activity vis-à-vis egg-yolk lecithin, as indicated by experiments carried out per pH-stat according to a method described previously (DENNIS E.A., J. Lipid Res., 1986, 14, 152-159). The most basic of these, named PLA2, is subjected to a further chromatography process on resin Biorex 70 in the presence of a linear gradient comprising between 0.60 M and 0.95 M. The PLA2 is finally subjected to high performance inverse phase liquid chromatography on a large pore Nucleosil 5 µm butyl column. The enzyme is eluted by an acetonitrile gradient, in a tri-fluoro-acetic water-acid mixture.

The elution profile is demonstrated in Fig. 1, which represents the elution profile of the *Naja nigricollis* venom, after chromatography on Biorex 70 ion exchange resin. The resin was equilibrated beforehand in a buffer of ammonium acetate 0.14 M, pH 7.4. The venom was then applied to the top of a column (30 x 1 cm). A fraction, not retained, is immediately eluted. It contains a phospholipase A2 as indicated by the presence of an asterisk. After elution of this fraction, an ammonium acetate gradient between 0.14 M and 1.4 M with the same pH is applied. The most toxic phospholipase A2, also indicated by an asterisk, is eluted in the last fraction i.e. the farthest to the right on the Fig. It is this fraction which is subjected to further chromatography on Biorex resin, and then HPLC.

Example B : Preparation of PLA2 - pBp:

The PLA2 obtained according to Example A is placed in contact with para bromo-phenacyl bromide (pBp), which is known to interact preferentially on the histidine of the active site of the phospholipases (VOLWERK et al., Biochem. 1974, 13, 1446-1454).

The experimental conditions of this treatment are as follows : 150 nmoles of PLA2 are made soluble in 2 ml of buffer cacodylate of sodium 0.1 M) [sic], containing 0.1 M of NaCl, pH 6. An excess of pBp (5 times molar) in 50 µl acetone is added to this solution. After 5 hours of continuous agitation in the dark at 30° C, the pH of the reagent mixture is brought to 3 by means of the addition of ice-cold acetic acid. The sample is lyophilised, and then subjected to high performance liquid chromatography (large pore butyl column). The product is then eluted in a gradient of increasing hydrophobicity (acetonitrile).

PHARMACOLOGICAL TESTS

Example 1 : Comparison of the sequences of PLA2 and its derivative pBp.

- Amino-acid sequence of PLA2

The complete amino-acid sequence of the basic phospholipase of venom from *Naja nigricollis* is determined on the basis of peptides obtained by cleavage using cyanogen bromide and by proteolysis with *A. Lyticus* lysylendopeptidase and *S. aureus* V8 protease.

The protein contains 118 amino-acids and possesses 14 residues 1/2 cystine.

The fractional distillation of the phospholipase treated with cyanogen bromine and carboxymethylated provides 3 peptides of 8, 49 and 61 amino-acids respectively.

Other fragmentations enable other sequences to be obtained. The recuperation of these different sequences has made it possible to establish the PLA2 sequence.

- pBp Derivative

The pBp-PLA2 derivative has lost one histidine per molecule and its molar extinction coefficient at 276.5 nm is 45 500.

Example 2 : Comparative toxicity of PLA2 and its derivatives

PLA2 and its derivatives were separately injected into mice (18-20g Balb c. females) by intravenous means. The PLA2 and its derivatives were dissolved in 0.3 ml. of physiological solute. A dose of 10 µg of unmodified PLA2 is fatal to each mouse. On the other hand, a dose of 2.3 mg of PLA2-pBp- is not lethal for any mouse.

TABLE I

Proteins	DL ₅₀
PLA2 - native basic	$5.7 \pm 0.2 \cdot 10^{-10}$ moles (7.7 ± 0.3 µg)
CNBr - PLA2	$> 1.63 \cdot 10^{-7}$ moles
pBp - PLA2	$> 1.60 \cdot 10^{-7}$ moles

Table I shows the DL₅₀ of PLA2, the derivative pBp-PLA2 and the derivative treated with CNBr [sic]. The toxicity was measured by injecting the doses indicated, made soluble in 0.3 ml. of physiological solute, into the vein in the tail of the mouse Balb c (20 ± 1 g). Survival was observed 24 hours after the injection and then, if necessary, every day for a week at least. The symbol > signifies that, at the dose indicated, the mice which got an injection did not die.

PLA2 is characterised by considerable lethal activity. In contrast, the two derivatives are non-toxic.

EXAMPLE 3 : Measurement of the cytotoxic activity of PLA2 and its derivative pBp.

The measurements of the cytotoxic activities of phospholipase PLA2 and its derivative pBp were carried out in the following manner : a suspension of cells from a defined homogeneous source, containing $3.5 \cdot 10^8$ cells per ml. in a PBS-DULBEC-CO medium, without calcium or magnesium, is given variable quantities of phospholipase or its derivative. Incubation continues for one hour at 37°. A colorant, trypan blue, is added to the medium. Only the cytolysed cells fix this colorant. Measurement of the number of cytolysed cells enables the cytotoxic activity of the compound being studied to be evaluated. This cytotoxic activity can be quantified by means of the concentration of the compound which kills 50 % of the cells studied (AC50), deducting background noise. The following

Table shows the cytotoxic concentrations (AC 50 %) of PLA2 and its derivative pBp in relation to eight cell lines, five of them tumoral and three of them healthy.

TABLE II

CELL SOURCES	PLA2 AC ₅₀ (M)	PLA2-pBp AC ₅₀ (M)
Mutated		
MCF7 (Ho)	$1.5 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$
HLGO (Ho)	$3 \cdot 10^{-8}$	$5.5 \cdot 10^{-8}$
SK-N-SH (Ho)	$5 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$
BW (Mu)	$3 \cdot 10^{-8}$	$> 8 \cdot 10^{-8}$
C13T (Mu)	$3 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$
Normal		
Peritoneal murine cells	10^{-5}	$> 8 \cdot 10^{-8}$
Splenetic murine cells	10^{-6}	$> 4 \cdot 10^{-8}$
Murine T lymphocytes	$6 \cdot 10^{-6}$	$> 8 \cdot 10^{-8}$

This Table indicates the concentrations of phospholipase A2 (PLA2) or modified phospholipase (pBp-PLA2), which it is necessary to use in order to kill mutated or normal cells. The expression $> x$ (where x represents a concentration expressed in mole/l) indicates that in the presence of the said concentration of PLA2 or its derivative, the cells concerned do not die.

It can be seen that the natural PLA2 is cytotoxic for all of the cell lines studied, whether healthy or tumoral. On the other hand, the derivative PLA2-pBp is characterised by its selective toxicity in relation to tumoral cells. Four of the five mutated lines are destroyed by this substance whereas the three healthy cellular lines are not altered.

Fig. 2 shows the cytolysis kinetics of the FL cells, in the presence of different concentrations of PLA2 from *Naja nigricollis* venom: the x-co-ordinate shows the time in hours, while the y-co-ordinate shows the cytolysis percentage:

- corresponds to 2 μ M of PLA2
- corresponds to 1 μ M of PLA2
- +
- x corresponds to 0.25 μ M of PLA2
- corresponds to 0 μ M of PLA2

The membrane lysis of the cells is shown by a penetration test using Trypan Blue.

This Fig. shows that the basic PLA2 is highly toxic and that the cytotoxic effect of PLA2 depends on both the incubation time and the concentration of PLA2.

EXAMPLE 4 : Measurement of the enzymatic activity of PLA2 and its derivatives

The enzymatic activity corresponds to the quantity of enzyme which hydrolyses per minute 1 μ mole of phosphatidylcholine at $5.5 \cdot 10^{-2}$ M, in the presence of Triton X100 0.11M at 40° C, pH 8. The values of Vmax are determined under the same conditions, using 10^{-8} M of PLA2.

Table III below shows that the basic PLA2 displays lipolytic activity on egg-yolk lecithin. The catalytic activity is distinctly higher in the presence of CA ++ than in the presence of Sr ++ and is not detected in the presence of EDTA, even in concentrations of PLA2 equal to 10^{-8} M.

TABLE III

	Enzymatic act. (pmoles of PLA2)	Km (mM)	Vmax (μ M NaOH/min.)
PLA2 (Ca^{++})	20 \pm 2	7.53 \pm 0.20	500 \pm 14
PLA2 (Sr^{++})	59 \pm 3	7.51 \pm 0.20	170 \pm 10
PLA2 (EDTA)	None		
CNBr-PLA2 (Ca^{++})	294 \pm 11	16.30 \pm 0.25	34 \pm 5
pBp- PLA2 (Ca^{++})	None		

Derivative pBp-PLA2 according to the invention does not display any detectable enzymatic activity; derivative CNBr-Pla2 displays a low but significant level of catalytic activity.

Figure 3 shows FL cell lysis after 60 mn of incubation in the presence of different concentrations of PLA2 (with \diamond 6 mM EDTA, \blacksquare 2mM Sr^{++} , \blacktriangle 2mM Ca^{++}) and derivatives chemically treated with cyanogen bromide (\circ) and para-bromo-phenacyl bromide (\square). These experiments were carried out at 37° C, except for \star (2mM Ca^{++} at 4° C). The other conditions were those used in the case of Fig. 2

The x-coordinate shows the concentration of protein in μ M, while the y-coordinate gives the percentage of lysed cells.

As shown by this Fig., the dose/response curves obtained with PLA2 in the presence or absence of calcium, in the presence or absence of strontium or in the presence or absence of EDTA are identical.

A check was made to verify that the presence of strong concentrations of divalent or EDTA cations does not modify the stability of cells during the incubation period.

Cell membrane lysis was carried out on FL cells at 37° C or 4° C for 60 minutes but no significant difference was found in respect of the curves at 4° C.

Two derivatives of PLA2 were also tested : these were pBp-PLA2 according to the invention, obtained after treatment with bromide of bromo-phenacyl and the derivative arising from cleavage of the PLA2 with cyanogen bromide in an acid medium.

Fig. 3 shows that the derivative pBp-PLA2 possesses cytotoxic activity vis-à-vis the FL cells, whereas the derivative treated with CNBr does not display any cytotoxic activity.

As emerges from the above, the invention is not confined in any way to those modes of production and application which have just been explicitly described: on the contrary, it covers all the variants which may occur to the mind of a skilled person in the area, without diverging from either the framework or scope of the present invention.

Claims

1° Basic protein of the phospholipase A2 (PLA2) type, isolated from the venom of snakes particularly of the family of the Elapidae, characterised by containing 118 amino-acids, having a molecular weight of the order of 13 325 Daltons, being obtained from the venom of snakes of the family of the Elapidae, particularly the Naja snake and more particularly Naja nigricollis and/or Naja mossambica pallida, or where relevant, by way of synthesis or cloning, and by displaying enzymatic activity and cytotoxic activity simultaneously.

2°) Protein in accordance with Claim 1, characterised by having the following Formula 1:

Asn¹-Leu-Tyr-Gin-Phe-Lys-His-Met-Ile-His¹⁰-Cys-Thr-Val-Pro-Ser-Arg-Pro-Val-Val-His²⁰-
Phe-Ala-Asp-Tyr-Gly-Cys-Tyr-Cys-Gly-Arg³⁰-Gly-Gly-Lys-Gly-Thr-Pro-Ile-Asp-Asp-Lcu⁴⁰-
Asp-Arg-Cys-Cys-Gin-Val-His-Asp-Asn-Cys⁵⁰-Tyr-Glu-Lys-Ala-Gly-Lys-Met-Gly-Cys-
Tyr⁶⁰-Pro-Tyr-Phe-Thr-Leu-Tyr-Lys-Tyr-Lys-Cys⁷⁰-Ser-Lys-Gly-Thr-Leu-Thr-Cys-Asn-Gly-
Arg⁸⁰-Asn-Gly-Lys-Cys-Ala-Ala-Ala-Val-Cys-Asn⁹⁰-Cys-Asp-Lcu-Val-Ala-Ala-Asn-Cys-
Phe-Ala¹⁰⁰-Gly-Ala-Pro-Tyr-Ile-Asn-Ala-Asn-Tyr-Asn¹¹⁰-Ile-Asp-Phe-Lys-Lys-Arg-
Cys-Gin¹¹⁸-OH.

3°) Fragment of the protein according to Claim 1 or Claim 2, characterised by being constituted of a peptide displaying the following sequence of amino-acids, which corresponds to the amino-acids at positions 1 to 8 of the said protein :

-Asn¹-Leu-Tyr-Gin-Phe-Lys-Asn-Met⁸-

4°) Fragment of the protein according to Claim 1 or Claim 2, characterised by being constituted of a peptide displaying the following sequence of amino-acids, which corresponds to the amino-acids at positions 55-59 of the said protein :

-Gly⁵⁵-Lys-Met-Gly-Cys⁵⁹-

5°) Fragment of the protein according to Claim 1 or Claim 2, characterised by being constituted of a peptide displaying the following sequence of amino-acids, which corresponds to the amino-acids at positions 44-50 of the said protein :

-Cys⁴⁴-Gin-Val-His-Asp-Asn-Cys⁵⁰-

6°) Derivatives of the protein in accordance with Claim 1 or Claim 2, displaying a modification of one of the histidines present in the sequence of the said protein, characterised by the fact of displaying a cytotoxic activity identical or analogous to that of the said protein, while not displaying the enzymatic activity of the said protein and by being modified by fixation on the said histidine of an alkyl group with the formula R-CH₂-X, where X is a halogen atom, preferably of bromine, and R is an aliphatic or aromatic group comprising between 1 and 20 atoms of carbon.

7°) Conjugates characterised by the fact of the protein according to Claim 1 or Claim 2, or the fragments and/or derivatives according to some one of Claims 2 to 6 being linked to a substance providing selective transport to an appropriate target, in particular a tumoral cell, the said transport substance being chosen from the group comprising in particular the hormones, polyclonal immunoglobulins and monoclonal immunoglobulins.

8°) Procedure for obtaining phospholipase A2 (PLA2) according to Claim 1 or Claim 2, characterised by the said protein being extracted from the venom of snakes from the Elapidae family, in particular the Naja snake, and more particularly Naja nigricollis or Naja mossambica pallida, by chromatography through exchange of ions followed by elution by an alkaline salt of a weak organic acid, in particular ammonium acetate, by the eluted fractions displaying enzymatic activity being subjected to a second chromatography process by exchange of ions, and by the protein thus isolated being subjected to high performance liquid chromatography in order to be purified.

9°) Procedure for obtaining derivatives according to Claim 6, characterised by the fact that, as a first stage, the phospholipase A2 is isolated by carrying out the procedure according to Claim 8, and as a second stage, the said phospholipase A2 being put in contact with an alkylant agent of type R-CH₂-X, where X is a halogen atom, and R is an aliphatic or aromatic group comprising between 1 and 20 atoms of carbon, to modify the phospholipase at the point of one of the histidines present in its sequence, by fixation of the alkylant agent to the said histidine.

10°) Procedure for obtaining the derivatives according to Claim 6, characterised by having the cDNA encoding for the protein according to Claim 1 or Claim 2 being modified by genetic means at the point of fragment 44-50 of the said protein.

11°) Procedure for obtaining fragments according to some one of Claims 3 to 5 characterised by the said fragments being obtained by proteolytic, in particular trypsin and/or chymotrypsin, split.

12°) Therapeutic compound particularly for the treatment of cancers, characterised by containing an active quantity of at least one derivative and/or at least one fragment, possibly linked with a substance for selective transportation to an appropriate target, in particular towards a tumoral cell, according to some one of the Claims 3 to 7, as an active principle, this derivative and/or fragment possibly being associated with any vehicle suitable for its administration.

13°) Agent for the detection of tumoral cells, characterised by being essentially constituted of a derivative and/or fragment according to some one of the Claims 3 to 6.

14°) A kit, or pack, or co-ordinated set, ready for use, for the detection of tumoral cells, characterised by containing:

- an appropriate quantity, possibly sub-divided into unit doses, of derivative and/or fragment in accordance with some one of the Claims 3 to 6,
- possibly an appropriate quantity of buffers, diluents and reagents, as necessary for carrying out the said detection.

15°) Kit according to Claim 14, characterised by the derivative being pBp-PLA2, obtained by the fixation of bromo-phenacyl bromide to histidine 47 of the protein in accordance with Claim 1 or Claim 2.